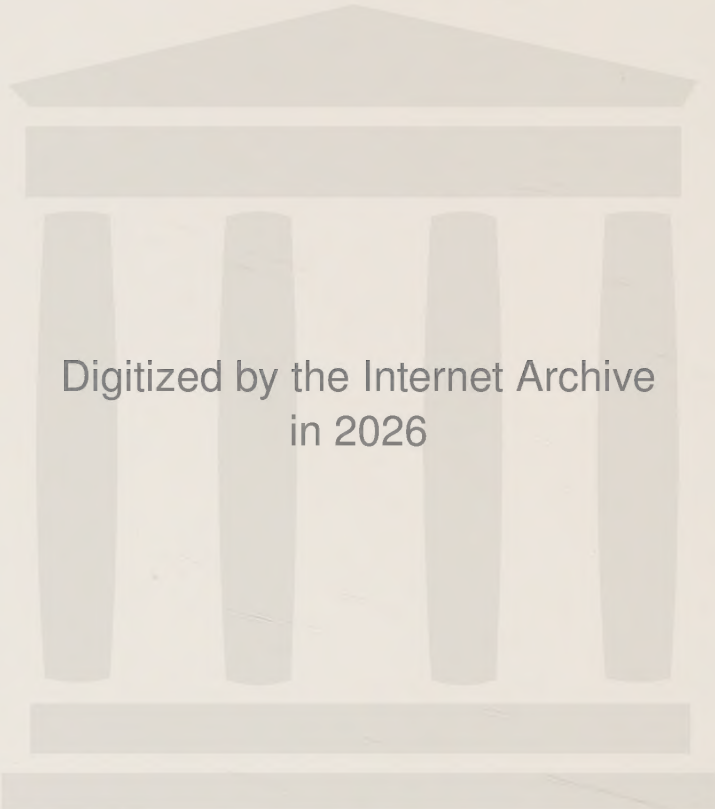


Waltraut Donalies

ÜBER DEN EINFLUSS VON THROMBOCYTEN-
EXTRAKTEN AUF DIE FIBRINFESTIGKEIT IM
THROMBELASTOGRAMM UND DIE ABGRENZUNG
DIESES FAKTORS VON DEN BISHER BEKANNTEN
THROMBOCYTENINHALTSSTOFFEN

Frankfurt am Main 1962



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554408_0019

Aus der I. Medizinischen Universitätsklinik zu
Frankfurt am Main
Direktor: Prof. Dr. med. F. H o f f

Über den Einfluß von Thrombocytenextrakten auf
die Fibrinfestigkeit im Thrombelastogramm und
die Abgrenzung dieses Faktors von den bisher be-
kannten Thrombocyteninhaltsstoffen

- - - - -

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten
Medizin der hohen Medizinischen Fakultät der
Johann Wolfgang Goethe-Universität zu
Frankfurt am Main

vorgelegt von

Waltraut D o n a l i e s
aus Weimar

Frankfurt/Main 1962

7983/67

Dekan: Prof.Dr. med. K. Herzberg
Referent: Prof.Dr. med. H. Fischer
Korreferent: Prof.Dr. med. J. Jürgens
Prof.Dr. rer.nat. A.Wacker
Mündliche Prüfung: 8.8.1962



Herrn Dr. Breddin danke ich für die Überlassung
der Fragestellung und die großzügige Unterstützung
bei der Durchführung der Untersuchungen und Zu-
sammenstellung der Ergebnisse.

G l i e d e r u n g

Seite:

A. Einleitung	1
B. Kurze Darstellung der bisher vorliegenden Arbeiten über den Einfluß der Thrombocyten auf Retraktion und Fibrinfestigkeit.	2
C. Eigene Untersuchungen	9
I. Methodik	9
II. Ergebnisse	13
1) Abhängigkeit der Fibrinfestigkeit von	13
a) verschiedenen Thrombocytenkonzentrationen	13
b) Glukose und Inosin	13
2) Ätherextraktion nach Stefanini	86
3) Gewinnung des Fibrinfestigkeitsfaktors:	17
a) Kältehämolys	18
b) Aqua-dest.-Hämolys	22
c) Mechanische Zerstörung der Thrombocyten	22
d) Thrombocytenaufarbeitung nach Schulz und Hiepler	22
e) Humanblut, Komplexon- und Zitratblut	23
4) Eigenschaften des Fibrinfestigkeitsfaktors:	25
a) Verdünnung	25
b) Abhängigkeit von Plasmafaktoren	25
c) Verhalten bei Ätherextraktion	27

d) Temperaturabhängigkeit	28
e) Ph-Optimum	28
f) Lagerungsstabilität	31
g) Ammonsulfatfällung	31
h) Adsorbierbarkeit	33
i) Dialyse	34
k) Eiweißgehalt des Plättchen- extraktes	34
5) Die Wirkung des Plättchenextraktes auf die Retraktion	34
6) Abtrennung von den bekannten Plättchen- faktoren:	36
a) Plättchenfaktor 1	36
b) Plättchenfaktor 2	38
c) Plättchenfaktor 3	39
d) Plättchenfaktor 4	40
e) Platelet-Cothromboplastin	41
f) Clottable faktor	42
g) Fibrinstabilisierender Faktor	44
E. Diskussion	46
F. Zusammenfassung	52
G. Literatur-Verzeichnis	54

A. Einleitung

Die entscheidende Bedeutung der Blutplättchen für die Blutgerinnung ist in der letzten Zeit durch zahlreiche Veröffentlichungen wieder herausgestellt worden. Hier ist besonders auf die Arbeit von Lüscher (1959) hinzuweisen. Entweder als intakte "Zellen" oder durch Abgabe von Inhaltsstoffen beeinflussen die Blutplättchen alle Phasen des Gerinnungsvorganges. Zahlreiche Funktionen der Thrombocyten konnten in den letzten Jahren aufgeklärt und auf verschiedene Faktoren zurückgeführt werden.

Es war das Ziel dieser Arbeit, zu untersuchen, auf welche Weise die Blutplättchen die Fibrinfestigkeit, gemessen im Thrombelastographen, beeinflussen.

B. Kurze Darstellung der bisher vorliegenden Arbeiten über den Einfluß der Thrombocyten auf Retraktion und Fibrinfestigkeit

Für manche Funktionen, die den Thrombocyten zugeschrieben wurden, ist noch nicht völlig geklärt, ob es sich um die Wirkung von Plasmaproteinen handelt, die nur an die Thrombocytenoberfläche adsorbiert sind, oder ob diese Eigenschaften den Thrombocyten selbst zuzuschreiben sind. Durch verschiedene Waschvorgänge versucht man, die an die Thrombocyten adsorbierten Plasmaeiweiße zu entfernen.

Die Bedeutung der Blutplättchen für die Retraktion des Blutgerinnsels ist seit Jahrzehnten bekannt und heute unumstritten. In den Arbeiten der letzten Jahre wird die Retraktion in erster Linie als eine Funktion intakter "lebender" Thrombocyten bezeichnet. Diese Auffassung stützt sich besonders auf den seit langen bekannten experimentellen Befund, daß nur "lebende" Thrombocyten in der Lage sind, eine Gerinnselretraktion auszulösen. Nach Schädigung und Zerstörung eines Teiles der Thrombocyten geht die Retraktionsfähigkeit in gleichem Maße verloren, wie die Zahl intakter Blutplättchen abnimmt. Untersucher, die die Retraktion auf einzelne Inhaltsstoffe der Thrombocyten zurückführen wollten, konnten bisher widerlegt werden. So wurden auch die Arbeiten von Fonio (1952) nicht bestätigt, der die Retraktionseigenschaft der Thrombocyten in das Hyalomer lokalisierte und der zu dieser Auffassung kam durch Untersuchung an durch Ultraschall zerstörten Thrombocyten. Wie Lüscher (1950) später zeigen konnte, waren diese Thrombocyten nicht völlig zerstört, und die mit ihnen erzielte Retraktion war durch "lebende" Blutplättchen bedingt.

Die schon von Le Sourd und Pagniez (1906) und später von Glanzmann (1918) geäußerte Vermutung, daß ein Thrombocyteninhaltsstoff im Sinne des "Retraktozyms" die Retraktion durch Verkürzung der Fibrinfasern bewirkt, ist demgegenüber etwas in den Hintergrund geraten. Diese Auffassung wurde trotzdem auch in den letzten Jahren wieder vertreten, so von Fonio (1952). Eine Zeit lang vermutete man, daß Serotonin für die Retraktion von Bedeutung sei. Diese Auffassung von Fenichel, Seegers (1955) und Ballerini (1955) wurde jedoch von Magalini und Stefanini (1956) und Lüscher (1956) widerlegt. 1958 konnten auch Deutsch und Martiny, Gross und Stauffenberg zeigen, daß Serotonin keinen Einfluß auf die Retraktion hat.

Magalini und Stefanini beschrieben 1956 eine lipoid-ähnliche Substanz, die sie mit Aceton und Äther aus Thrombocyten extrahierten und die sie Retraktin nannten, da sie geronnene Fibrinogenlösungen zur Retraktion brachte.

Viele Autoren wiesen auf die enge Beziehung zwischen der viskösen Metamorphose der Thrombocyten und der Gerinself retraktion hin. Lüscher schrieb 1959: "Zum erfolgreichen Ablauf der Retraktion sind in den Plättchen eine ganze Reihe von Substanzen nötig: Ein intaktes glykolytisches Fermentsystem sowie kontraktiles Material und Energieüberträger irgendwelcher Art, die eine sinnvolle Verbindung zwischen glykolytischem System und kontraktilem Substrat darstellt. Eine solche kontraktile Substanz würde auch am ersten einem Retraktozym der älteren Schule entsprechen."

Neben den Thrombocyteninhaltsstoffen spielen mit Sicherheit Plasmafaktoren, die man unter dem Begriff des sogenannten Retraktions-Cofaktors zusammenfaßt, für die

Retraktion eine Rolle. Lüscher (1956) und Bounameaux (1956) konnten zeigen, daß als "Minimalfaktoren" zur Auslösung der Retraktion die Anwesenheit von Glukose und Calcium- oder Magnesiumionen bei geeigneter Wasserstoffionenkonzentration notwendig sind. Die Arbeiten von Hartert (1954) und Hartert, Lasch und Pfisterer (1957) machen es allerdings wahrscheinlich, daß noch andere Plasmafaktoren, bei denen es sich wahrscheinlich um Eiweißkörper handelt, für eine optimale Retraktion notwendig sind. Die Untersuchungen dieser Autoren wurden besonders mit dem Thrombelastographen durchgeführt.

Mit der Thrombelastographie nach Hartert (1957) ist eine fortlaufende Aufzeichnung des Gerinnungsvorganges möglich. Diese Methode eignet sich besonders zur Messung der Gerinnselfestigkeit. Diese geht, wie sich besonders aus den Arbeiten Hartert's (1952) ergibt, mit der Retraktion weitgehend parallel. Sie ist daher auch ein Maß für die Funktion der Thrombocyten. Die Fibrinselfestigkeit im Thrombelastogramm (TEG) wird allerdings ebenfalls beeinflußt durch den Fibrinogenspiegel, durch den von Hartert (1954) beschriebenen Retraktions-Co-faktor, der im einzelnen nicht definiert ist, und schließlich durch die Vorgänge der Fibrinolyse. Eine strenge Parallelität zwischen Gerinnselfestigkeit im TEG und Retraktion besteht somit nicht.

Vor kurzem beschrieb Lüscher (1959) das kontraktile Protein als einen Inhaltsstoff der Thrombocyten, von dem er annahm, daß er eine wesentliche Bedeutung für den Retraktionsmechanismus habe. Lüscher vermutet, daß das kontraktile Protein unter dem Einfluß von Zellenergie in Form der Adenosintriphosphorsäure die Retraktion bewirkt.

Die Messung der Gerinnselretraktion ist in größerem Maße von den Thrombocyten abhängig als die Messung der Fibrinfestigkeit im TEG. Allerdings hängt auch das Ausmaß der Retraktion bei einem Teil der gebräuchlichen Untersuchungsmethoden von der Höhe des Fibrinogenspiegels ab.

Der im folgenden gebrauchte Begriff "Fibrinfestigkeit" bezieht sich auf die im TEG gemessene Gerinnselfestigkeit.

Marx berichtete 1957 über Versuche mit zerstörten Thrombocyten an verschiedenen Testsystemen. Er fand eine Verminderung der Fibrinfestigkeit, d.h. also eine Verschmälerung der TEG-Kurve, unter dem Einfluß seiner Blutplättchenhomogenisate. Diese Befunde weichen von unseren Ergebnissen ab. Sie sind wahrscheinlich durch eine völlig andere Untersuchungstechnik bedingt.

Klinische Untersuchungen ergeben bei Thrombocytenopenien, aber auch bei Thrombocytopathien Verminderungen der Gerinnselfestigkeit im TEG und eine gestörte Retraktion. Dabei ist es schon lange bekannt, daß eine auffallende Parallele besteht zwischen dem Auftreten von Blutungen, insbesondere in Form von petechialen Herden, und dem pathologischen Ausfall der Thrombelastographie oder der Retraktionsmessung.

Das Auftreten von Blutungen bei diesen Thrombocytenfunktionsstörungen wird auf eine Störung der Kapillarabdichtung zurückgeführt, wobei die Rolle, die die Blutplättchen hierbei spielen, noch nicht genügend bekannt ist. Besonders die Beobachtungen an erblich bedingten und an erworbenen Thrombocytopathien lassen Beziehungen zwischen dem Retraktionsmechanismus und der

Gefäßabdichtung vermuten.

Störungen der Thrombocytenfunktion sind häufig bei Leberkranken zu beobachten. So fand Breddin (1960) bei Leberkranken mit normaler Plättchenzahl eine Beeinträchtigung der Plättchenfunktion, zum Teil mit den klinischen Erscheinungen einer haemorrhagischen Diathese, die sich besonders in einer verminderten Fibrinfestigkeit im TEG und einer gestörten Retraktion äußerten. Die Ursache dieser Thrombozytenfunktionsstörungen ist wahrscheinlich eine "Hypersplenie" und nicht eine eigentliche Leberfunktionsstörung.

Nach Benthaus (1959) geht die im TEG gemessene Gerinnselfestigkeit mit der Plättchenzahl parallel. Auch Marshall und Leroux (1957) fanden eine Abhängigkeit der Maximalbreite der TEG-Kurve von der Plättchenzahl. Hartert (1957) spricht von der zentralen Bedeutung der Thrombocyten für den Gerinnselaufbau. Er zeigte, daß bei sinkender Thrombocytenzahl im Plasma ~~ein Fortschreiten~~ die im TEG erzielten Maximalausschläge fortschreitend abfallen. Hartert führt den Einfluß der Thrombocyten auf eine starke Spannungsvermehrung des Fibringerinnsels zurück.

Fibrinfestigkeit und Retraktion sind zwei Funktionen der Thrombocyten, die offenbar weitgehend parallel laufen. Doch sind sie nicht immer gleichzusetzen. Klinisch sind Störungen der Retraktion bei normaler Fibrinfestigkeit zu beobachten, besonders dann, wenn der Fibrinogenspiegel in dem untersuchten Blut hoch ist. Die Gerinnselfestigkeit im TEG kann dann normal sein, während die Retraktion deutlich gestört ist. Die folgenden Abbildungen 1 und 2 zeigen das Ergebnis einer eigenen Versuchsreihe, bei der zu einer kleinen Plasamenge

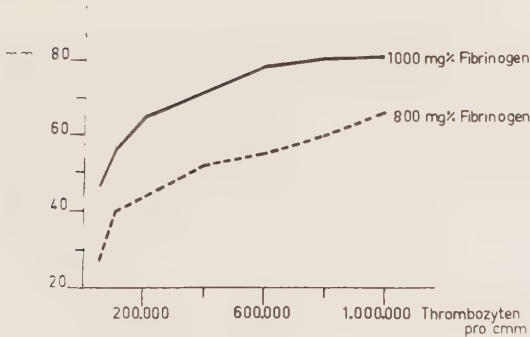
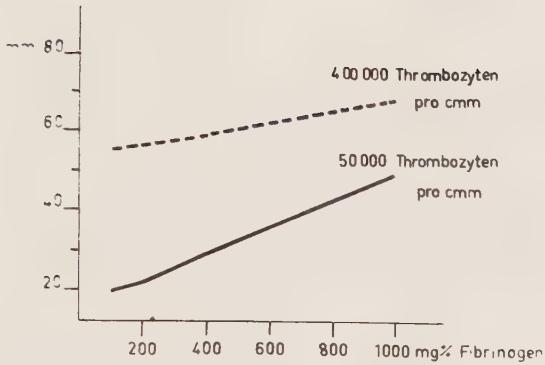


Abb. 1 und 2: Abhängigkeit der Fibrinfestigkeit von der Fibrinogenkonzentration

Ansatz: 0,1 ml Fibrinogenlösung
 0,05 ml Thrombocyten
 0,2 ml thrombocytenfreies Plasma
 0,05 ml CaCl_2 -Lösung (1/10 mcl)

Auf den Kurven sind die Endkonzentrationen von Fibrinogen und Thrombocyten angegeben

unterschiedliche Mengen von Thrombocyten und Fibrinogen zugesetzt wurden.

Es war das Ziel der vorliegenden Arbeit zu klären, ob auch Thrombocyteninhaltsstoffe nach der Zerstörung der Zellen und damit nach der Ausschaltung ihrer Funktion als "lebende Zellen" in der Lage sind, die Fibrinfestigkeit im TEG oder die Retraktion zu beeinflussen. Zu Beginn dieser Untersuchungen war die Beobachtung von Lüscher (1959) über das kontraktile Protein noch nicht bekannt.

Bei unseren Arbeiten erwies sich die Thrombelastographie bei geeigneter Versuchsanordnung als eine durchaus zuverlässige Methode.

Es ergab sich, daß Thrombocyten einen Faktor enthalten, der die Fibrinfestigkeit eines thrombocytenfreien Normalplasmas erhöht. Diese Substanz ist wahrscheinlich nicht identisch mit den Plättchenfaktoren 1 bis 4. Es handelt sich offenbar um ein Protein. Durch Zugabe von Adenosintriphosphat konnte die Wirkung dieses Eiweißkörpers im Thrombelastographen gesteigert werden. Im Gegensatz zu dem Einfluß auf die Fibrinfestigkeit ist die meßbare Wirkung dieses Thrombocyteninhaltsstoffes auf die Retraktion gering.

C. Eigene Untersuchungen

I. Methodik

Die Fibrinfestigkeit wurde mit dem Thrombelastographen nach Hartert (1957) gemessen. Hartert selbst beschreibt die Methode "als eine sehr genaue Meßeinrichtung, die quantitativ in dem gerinnenden Blut auftretende elastische Spannungen feststellt, die bei Ende der Retraktionszeit, die der Gerinnungszeit entspricht, zum ersten Mal erscheinen und im Verlaufe von 10 bis 20 Minuten auf das Mehrhundertfache anwachsen können. Die erreichte Maximalspannung läßt innerhalb von einigen Stunden wieder etwas nach. Hier erfolgt ein durch die Fibrinolyse verursachter Abfall. Die Thrombelastographie ermöglicht also sowohl die zeitlich genaue Festlegung aller Gerinnungsphasen als auch eine qualitative Bestimmung der Fibrinolyse, der Thrombocytenfunktion und der physikalischen Eigenschaften des Fibrins."

Um den Einfluß der Zellplasmarelation auf die Fibrinfestigkeit (De Mattis und Vulpis (1959) auszuschalten, wurden alle Untersuchungen an Plasma durchgeführt, aus dem die Erythrocyten, die Leukocyten und insbesondere auch die Thrombocyten durch hochtouriges Zentrifugieren entfernt waren.

Es war zunächst schwierig, mit Plasma im TEG ein einheitliches Ergebnis zu erzielen. Das Plasma muß recalcifiziert werden. Die Recalcifizierung kann in der Kuvette des Thrombelastographen selbst oder schon vor Einbringen des Gemisches in den Thrombelastographen erfolgen.

Um die verlässlichste Methode zur Recalcifizierung zu ermitteln, wurden die Kuvetten des Thrombelastographen auf drei verschiedene Arten mit dem Gerinnungsgemisch gefüllt.

- 1) 0,3 ml Plasma und 0,1 ml einer 1/10 molaren Calciumchloridlösung (CaCl_2 -Lösung) wurden nacheinander in die Kuvette einpipettiert, ohne zu mischen.
- 2) Plasma und Calciumchloridlösung wurden wie 1) in die Kuvette nacheinander eingefüllt und dann durch 3-maliges Senken des Stempels gemischt.
- 3) 0,6 ml Plasma und 0,2 ml CaCl_2 wurden in ein silikonisiertes Reagenzglas einpipettiert und durch mehrfaches kurzes Schütteln gründlich durchmischt. Von diesem Ansatz wurden 0,4 ml mit der Pipette entnommen und in die vorgeheizte Kuvette eingefüllt.

Mit der letzten Methode gelang es bei zahlreichen Versuchen, übereinstimmende Kurven zu erhalten. Es mußte allerdings darauf geachtet werden, daß die Röhrchen möglichst gleich lange geschüttelt wurden. Die Fehlerbreite der anderen beiden Methoden war demgegenüber erheblich größer.

Bei Verwendung des gleichen Plasmas wurden die Kurven mit 1/10 molarer CaCl_2 -Lösung breiter als mit einer 1/20 oder 1/5 molarer Lösung. Diese CaCl_2 -Konzentration ist wohl die optimale, wie auch das den Arbeiten von Hartert (1952 und 1957) hervorgeht. Bei allen Untersuchungen wurde das Plasma als Zitratplasma im Verhältnis 1 zu 10 (1 Teil Zitrat und 9 Teile Blut) gewonnen.

Grundsätzlich wurde zu jedem thrombelastographischen Ansatz ein Leerversuch durchgeführt. Es kam folgender Ansatz zur Anwendung:

Zu 0,25 ml Plasma und 0,05 ml CaCl_2 wurden 0,1 ml einer Testsubstanz, deren Wirkung auf die Fibrinfestigkeit geprüft werden sollte, zugegeben.

(Es handelt sich hierbei um die Mengen, die tatsächlich in die Kuvetten des Thrombelastographen einpipettiert wurden. In das zur Recalzifizierung verwendete silikonisierte Reagenzglas wurden jeweils die doppelten Mengen eingefüllt.) Geprüft wurden in erster Linie Thrombocytenextrakte, die auf verschiedene Weise bearbeitet worden waren. Im Leerversuch wurden die 0,1 ml Testsubstanz durch physiologische Kochsalzlösung (phys. NaCl) ersetzt. Bei einem Teil unserer Untersuchungen wurde besonders auf einen konstanten Ph-Wert geachtet. Es zeigte sich, daß die Fibrinfestigkeit in einem leicht saurem Milieu von Ph 7,2 - 7,6 am größten ist.

Da die Fibrinfestigkeit im TEG außer von der Thrombocytenfunktion auch vom Fibrinogenspiegel, dem sogenannten Retraktions-Cofaktor und den Vorgängen der Fibrinolyse abhängt, erfolgten die Untersuchungen an einem System, in dem bei gleichem Plasma die Zahl der Thrombocyten oder die Konzentration verschiedener Plättchenextrakte variiert wurden.

Die Herstellung des thrombocytenfreien Plasmas:

Blutentnahme als Zitratblut 1 zu 10 im silikonsierten Gefäß, kurzes Zentrifugieren bei 2000 g, abpipettieren der Plasmaschicht und erneutes Zentrifugieren von 20 Min. Dauer bei 3000 g. Es wurden nur die oberen 2/3 des so zentrifugierten Plasmas für die Ansätze im TEG verwendet. Es wurde stets ein Mischplasma von 5-10 Personen verwendet.

Für die Mehrzahl unserer Untersuchungen wurden Thrombocyten aus Schweineblut gewonnen, welches in größeren Mengen zu erhalten war. Schweinethrombocyten verhalten sich funktionell außerordentlich ähnlich wie menschliche Blutplättchen (Ponio) 1952. Die Ergebnisse konnten später auch mit menschlichen Thrombocyten reproduziert werden.

Die Herstellung der Thrombocyten suspensionen:

Blutentnahme mit Komplexon in einer Endkonzentration von 0,1 % bei Silikontechnik. 200 ml spontan sedimentiertes Plasma wurde bei + 4° 20 Min. lang mit 3000 UPM zentrifugiert. Der die Thrombocyten enthaltende Niederschlag wurde mit 30 ml Waschflüssigkeit (phys. NaCl + Komplexon in einer Endkonzentration von 0,1 %) aufgeschwemmt und 3 bis 5 Min. bei 1750 UPM zentrifugiert. Im Überstand fanden sich die Thrombocyten in einer trüben Suspension und wurden abgegossen. Der Niederschlag enthält neben Erythrocyten und Leukocyten noch reichlich Thrombocyten und wurde in 30 ml Waschflüssigkeit (wie oben) 3-5 Min. bei 1750 UPM zentrifugiert und der noch thrombocytenhaltige Überstand wiederum abgegossen. Die so gewonnenen Thrombocyten suspensionen wurden durch 20 minütiges Zentrifugieren bei 3000 UPM sedimentiert, der

Überstand verworfen und die Flättchen in phys. NaCl resuspendiert. Bei einem Teil der Untersuchungen wurden zahlreiche weitere Waschungen der so gewonnenen Thrombocyten mit phys. NaCl oder mit einer Komplexonkochsalzlösung durchgeführt.

Retraktionsmessung

Hierzu benutzten wir das von Breddin (1960) modifizierte Verfahren nach Fonio (1953), Bucher (1956) und Benthaus (1959), bei dem die Retraktion nur noch von der Funktion der Thrombocyten und nicht mehr vom Fibrinogengehalt des jeweiligen Testplasmas abhängig ist.

Bei dieser Methode werden 0,5 ml Thrombocyten oder 0,5 ml der jeweiligen zu untersuchenden Testsubstanz in ein Röhrchen gegeben, welches 1 ml thrombocytenfreien Normalplasma und 3 ml phys. NaCl-Lösung oder 3 ml eines Michaelispuffers von einem Ph-Wert von 7,6 enthält. Nach Zufügen von 1 ml einer 1/40 molaren CaCl_2 -Lösung und 0,1 ml einer Thrombinlösung (40 Einheiten pro ml) wird das Gemisch durch einmaliges Umkippen geschüttelt und gerinnt in wenigen Sekunden. Das Lösen des Gerinnsels von der Glaswand gelingt leicht durch ruckartiges Drehen des Röhrchens um die Längsachse (Benthaus 1959). Einstellen der Röhrchen in ein Wasserbad von 37°, Ablesung nach 3-4 Stunden und Angabe der Retraktion entweder in Stufen von 0 bis 5+ oder besser in ml der ausgepressten Flüssigkeit nach vorsichtigem Entfernen des Gerinnsels aus dem Ansatz mit einer Fincette. Der Leerwert (Normalplasma ohne Thrombocytenzusatz oder ohne Zusatz der Testsubstanz) darf nicht retrahieren. Eine Umrechnung in Prozente ist leicht möglich. 100% = 6,5 ml ausgepresste Flüssigkeit. Dieser Wert kann natürlich nicht erreicht werden.

Thrombocytenzählung erfolgte nach Feissly-Lüdin (1949) mit dem Phasenkontrastmikroskop.

II. Ergebnisse

1) Abhängigkeit des Fibrinfestigkeitsfaktors von a) verschiedenen Thrombocytenkonzentrationen

In einem Vorversuch wurden noch einmal die Beziehungen zwischen Fibrinfestigkeit im TEG und der Zahl funktionstüchtiger Thrombocyten festgestellt. Das Ergebnis zeigt die Abbildung 3.

Zu 0,25 ml thrombocytenfreien Plasmas wurden 0,1 ml Thrombocyten suspension verschiedener Konzentration und 0,05 ml der 1/10 molaren CaCl_2 -Lösung zugegeben. Die sich ergebende Abhängigkeit der Fibrinfestigkeit von der Thrombocytenzahl entspricht den Befunden von Hartert (1959), Benthaus (1959), Introzzi (1955), De Nicola (1955), Fonio (1953) und anderen.

b) Glukose und Inosin

Bounameaux (1956) und Lüscher (1956) beschrieben die Glukose als einen Cofaktor der Retraktion, der bei Anwesenheit eines Veronalacetatpuffers und nach Incubation der Thrombocyten mit Glukose die Retraktion möglich macht. Es wurde deshalb der Einfluß verschiedener Glukosekonzentrationen auf die Fibrinfestigkeit im TEG untersucht, durch Zugabe einer 1, 5 und 10%igen Glukoselösung. Als Puffer wurde ein Veronalacetatpuffer mit einem Ph von 7,6 verwendet.

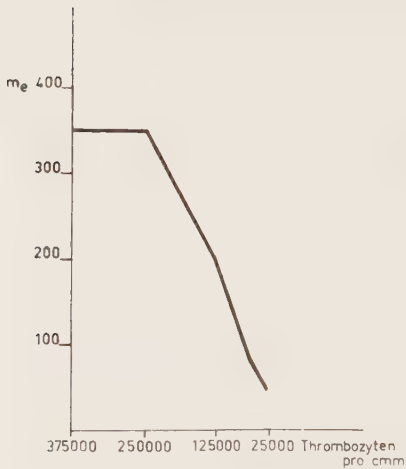


Abb. 3: Abhängigkeit der Fibrinfestigkeit von der Thrombocytenzahl

Ansatz: 0,1 ml Thrombocyten suspension
0,25 ml thrombocytenfreies Plasma
0,05 ml CaCl_2 -Lösung (1/10 mol)

Auf der Kurve sind die Endkonzentrationen der Thrombocyten angegeben.

Ohne Incubation

Glukoseendkonzentration	m_e	m_e des zugehörigen Leerwertes
12,5 mg%	57	61
125 mg%	37	43
125 mg%	38	44
625 mg%	72	72
625 mg%	70	67
1250 mg%	72	72
1250 mg%	70	67

Ein wesentlicher Einfluß der Glukose auf die Fibrin-
festigkeit war in diesem thrombocytenfreien System
somit nicht festzustellen.

Es wurden nun zu 1 ml konzentrierter Schweinethrom-
bocytensuspension 0,5 ml Glukose verschiedener Kon-
zentration und 0,5 ml Michaelispuffer hinzugefügt und
diese Mischung 30 Min. lang bei 37° inkubiert.

Wenn von dieser Mischung 0,1 ml mit 0,25 ml thrombocy-
tenfreiem Plasma im TEG getestet wurden, so zeigte sich
paradoxe Weise eine zunehmende Verlängerung der Gerin-
nungszeit und eine Verschmälerung der Kurve in Abhän-
gigkeit von der steigenden Glukosekonzentration.

Einfluß von Glukose auf die
Fibrinfestigkeit nach Incubation mit Thrombocyten

Glukoseendkonzentration	m _e	Gerinnungszeit
1250 mg%	43	30'
125 mg%	79	12' 15''
Leerwert	144	10 ''
12,5 mg%	54	21'
1,25 mg%	61	10' 15''
Leerwert	61	10'

Bei gleichen Untersuchungen mit Inosin konnte mit und ohne Incubation kein Einfluß auf die Fibrinfestigkeit festgestellt werden.

2) Ätherextraktion nach Stefanini

Magalini und Stefanini beschrieben 1956 einen Thrombocytenfaktor, den sie durch Äther- oder Acetonextraktion aus Thrombocyten freisetzten und den sie Retraktin nannten. Dieses Retraktin ermöglichte nach ihren Untersuchungen ohne Anwesenheit lebender Thrombocyten die Retraktion von Fibrinogen, das mit Thrombin zur Gerinnung gebracht worden war.

Entsprechend den Angaben von Magalini und Stefanini wurden etwa 3 ml einer konzentrierten Thrombocyten-suspension (10 Mill. Blutplättchen pro cmm) mit 3 ml Äthyläther ausgeschüttelt und 10 Min. bei 1000 g zentrifugiert.

Dabei setzten sich 3 Schichten ab, aus denen nach Trennung derselben der Äther im Exsiccator abgesaugt wurde. Von diesen 3 Schichten wurden je 0,1 ml mit 0,25 ml thrombocytenfreien Plasmas 30 Min. lang incubiert. Die Ätherphase war dabei stets mit 2 ml phys. NaCl resuspendiert worden, da nach Absaugen des Äthers im allgemeinen nur ein trockener Rückstand verblieb.

Schicht	m_e	m_e des zugehörigen Leerwertes
Äther-	59	59
Äther-	30	30
Mittel-	69	52
Mittel-	75	37
Unter-	52	32
Unter-	104	43

Aus vorstehender Tabelle ist zu ersehen, daß die Ätherschicht die Fibrinfestigkeit nicht erhöhte, jedoch die Mittel- und Unterschicht. Mit keiner dieser 3 Schichten konnten wir eine Retraktion auslösen.

3) Gewinnung des Fibrinfestigkeitsfaktors

Es ergab sich die Frage, ob sich mit anderen Mitteln aus Thrombocyten ein Faktor freisetzen läßt, der die Fibrinfestigkeit beeinflusst, unabhängig von der Funktion der Blutplättchen als "lebende Zellen". Auf Grund der Überlegungen Magalinis und Stefaninis (1956) versuchten wir, diese aktive Substanz durch vollstän-

diges Zerstören der Blutplättchen freizusetzen.

a) Kältehämolyse

Eine Thrombocyten suspension (8-15 Mill. Thrombocyten pro cmm) wurde 15 mal in einer Kältemischung aus Aceton und Kohlensäureschnee eingeforen und sofort anschließend in einem Wasserbad von 37°C wieder aufgetaut. Die so behandelten Thrombocyten zeigten im Retraktionstest keinerlei Retraktion mehr. Daraus kann man folgern, daß sie tatsächlich zerstört waren. Diese Thrombocytenrümmen bewirkten jedoch im plättchenfreien Plasma bei Testung im TEG eine deutliche Zunahme der Kurvenbreite gegenüber dem Leerversuch. Die Größenordnung der Verbreiterung der thrombelastographischen Kurven durch die zerstörten Thrombocyten geht aus folgendem Versuch hervor:

0,25 ml thrombocytenarmes Plasma + 0,1 ml Thrombocyten suspension (8-15 Mill. pro ccm) + 0,05 ml CaCl_2 -Lösung ergibt eine maximale Breite der TEG-Kurve von 85 mm = 567 m_e und dann oft einen Abriß. (Das Abreißen derartiger Kurven im TEG bei maximaler Festigkeit ist wahrscheinlich durch Losreißen des Fibrins von der Kuvettenwand infolge einer starken Spannung der Fibrinfasern bedingt. Dieses Abreißen wird auch oft als Stufenphänomen bezeichnet). Ersetzt man die Thrombocyten durch phys. NaCl, so beträgt die Kurvenbreite lediglich 29 bis 30 mm = 41 bis 43 m_e . Wenn nun anstatt der unbehandelten Thrombocyten die 15mal eingefrorenen Plättchen verwendet werden, so wird die Kurve etwa 50 mm = 100 m_e breit. Dieser Unterschied von 20 mm gegenüber dem Leerversuch ließ uns vermuten,

daß es sich hierbei um die Wirkung einer Substanz handelt, die aus den zerstörten Thrombocyten frei geworden ist und die die Fibrinfestigkeit steigert. (Siehe Abb. 4).

Es galt nun den Einwand zu entkräften, daß vielleicht doch noch "lebende" Blutplättchen in der 15mal eingefrorenen und wieder aufgetauten Thrombocyten suspension enthalten waren, die die Steigerung der Fibrinfestigkeit verursachten. Gleichzeitig war festzustellen, ob die Wirkung auf die Fibrinfestigkeit an die Zelltrümmer der Thrombocyten gebunden war.

Die Thrombocyten suspension wurde 15mal eingefroren und wieder aufgetaut und dann 40 Min. lang in der Ultrazentrifuge (Spinco) bei 105 000 g zentrifugiert. Bei Prüfung an thrombocytenarmem Plasma hatten sowohl der Überstand als auch der Niederschlag, der die Zellreste enthielt, die gleiche fibrinfestigkeitssteigernde Wirkung.

Schicht	m_e	m_e des zugehörigen Leerwertes
Ober-	79	54
Mittel-	79	54
Unter-	60	47

Die Ultrazentrifugierung wendeten wir in der Folgezeit ständig an, um die Zellreste und insbesondere auch den Plättchenfaktor 3 abzutrennen. Mit Sicherheit war aus diesem Versuch abzuleiten, daß die fibrinfestigkeitserhöhende Wirkung des Überstandes nicht mehr durch "lebende" Thrombocyten hervorgerufen sein konnte.

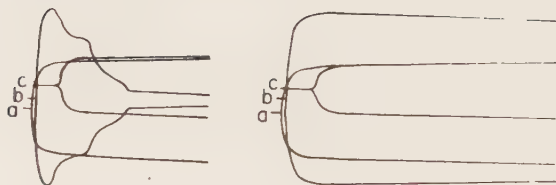


Abb. 4: Der Einfluß von Thrombocytenextrakten auf die Fibrinfestigkeit im TEG

Ansatz: 0,25 ml thrombocytenfreies Plasma
0,05 ml CaCl_2 (1/10 mol)
0,1 ml von a) Thrombocytenextrakt
b) Thrombocyten (15 Mill.pro cmm)
c) phys. NaCl

Mit der von Gofmann (1957) angegebenen Flotations-technik prüften wir, ob es sich bei der wirksamen Substanz um ein mit dieser Technik abtrennbares Lipoprotein handelte. Das Prinzip dieser Methode besteht darin, daß eine zu untersuchende Flüssigkeit auf ein hohes spezifisches Gewicht gebracht wird und dann mehrere Stunden ultrazentrifugiert wird, wobei sich die leichteren Bestandteile in der Oberschicht flotierend anreichern. Entsprechend wurde der Thrombocytenextrakt nach Abzentrifugieren der Zellreste auf eine Dichte von $1,0630 \pm 0,005$ gebracht durch Verwendung einer konzentrierten NaCl-Lösung und dann 14 bis 16 Stunden lang bei 79 420 g zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurden die Oberschicht, welche als fettigtrübe Phase einen Teil der Lipoproteine enthielt, sowie die mittlere Schicht und das Sediment getrennt entnommen und zunächst einige Stunden gegen fließendes Wasser und dann 5 Stunden lang gegen phys. NaCl dialysiert. Die so gewonnenen Fraktionen wurden an thrombocytenfreiem Plasma im TEG ausgetestet.

Schicht	m_e	m_e des zugehörigen Leerwertes
Ober-	92	54
Mittel-	96	56
Unter-	104	54

Aus diesen Versuchen ergab sich, daß es sich bei dem Faktor, der die Fibrinfestigkeit steigert, nicht um eines der Lipoproteine handelt, die sich in der Obersicht bei dieser Versuchsanordnung "flotierend" anreichern hatten. Es gelang auch nicht, den Faktor durch das 15-stündige Zentrifugieren zu sedimentieren.

b) Aqua-dest.-Hämolyse

Werden die dicht gepackten Thrombocyten statt mit phys. NaCl mit aqua dest. versetzt, so kommt es zu einer weitgehenden Lyse der Thrombocyten. Mit dem Überstand der zentrifugierten Plättchentrümmersuspension erhält man eine Kurvenbreite im TEG von 40 mm = 67 m_e gegenüber einem Leerwert von 30 mm = 43 m_e. Auch auf diese Weise läßt sich also der "Fibrinfestigkeitsfaktor" nachweisen, jedoch ist es durch Zugabe von aqua dest. immer nur möglich, einen Teil der Thrombocyten zu zerstören und zur Auflösung zu bringen, während noch ein erheblicher Teil unzerstört bleibt.

c) Mechanische Zerstörung der Thrombocyten

Wird eine Suspension intakter Thrombocyten mit einem Glasstab intensiv zerrieben und anschließend ultrazentrifugiert (40 Min. lang bei 105 000 g) um alle Zelltrümmer und die noch unzerstörten Thrombocyten zu entfernen, so ist mit der überstehenden Phase im TEG eine Verbreiterung gegenüber dem Leerwert von 10 bis 20 mm zu erzielen. Die Dauer des Zerreibens war für die Freisetzung des Faktors, der die Fibrinfestigkeit steigert, offenbar von Bedeutung. Das 5 Minuten - und 15 Minuten lange Zerreiben einer Suspension von 10 Mill. Thrombocyten pro cmm ergab im TEG eine Kurvenbreite, die 15 mm größer war als die des Leerversuchs.

d) Thrombocytenaufarbeitung nach Schulz und Hiepler

Schulz und Hiepler (1959) brachten eine Thrombocyten-suspension 4mal auf eine Temperatur von - 20° für die Dauer von 15 Min. und tauten sie anschließend bei 37°

wieder auf. Aus dieser Suspension gelang es ihnen, durch differenziertes Zentrifugieren reine Hyalomer- und Granulomerfraktionen herzustellen. Nach Deutsch (1955), Fonio (1952), Schulz und Hiepler (1959) und anderen Autoren ist das Hyalomer Sitz der retraktions- auslösenden Faktoren. Das Granulomer enthält dagegen die gerinnungseinleitenden Substanzen, in erster Linie den Plättchenfaktor 3. Uns interessierte, in welcher dieser Strukturen der Blutplättchen der "Fibrin- festigkeitsfaktor" enthalten ist. Entsprechend den Angaben von Schulz und Hiepler (1959) wurden die von ihnen beschriebenen Fraktionen 3 und 4 hergestellt, wobei die Fraktion 3 vorwiegend Hyalomer enthalten soll und die Fraktion 4 ausschließlich Granulomer. Zu diesem Zweck wurden die Thrombocyten suspensionen, wie oben angegeben, eingefroren und aufgetaut und anschließend 30 Min. lang bei 1400 g zentrifugiert. Der Niederschlag wurde verworfen. Der Überstand wurde 10 Min. lang bei 6500 g zentrifugiert, der so erhaltene Niederschlag entspricht der Fraktion 3 nach Schulz und Hiepler. Der Überstand wurde 30 Min. lang bei 14 000 g zentrifugiert. Der dadurch erhaltene Niederschlag entspricht der Fraktion 4 der genannten Autoren. Die beiden Fraktionen wurden in phys. NaCl aufgeschwemmt und ihre Wirkung auf die Fibrin- festigkeit im TEG und auf die Retraktion geprüft. Beide Suspensionen zeigten keinerlei Wirkung auf die Retraktion und beide verbreiterten die thrombelastographische Kurve in gleicher Weise um 10 mm. Mit dieser Technik gelang es somit nicht, den Fibrin- festigkeitsfaktor nur in eine der beiden Fraktionen zu lokalisieren.

e) Humanblut, Komplexon- und Zitratblut

Wurden die Schweinethrombocyten durch menschliche Blutplättchen ersetzt, so fand sich die gleiche Wirkung des Plättchenextraktes auf die Fibrin- festigkeit im TEG.

Um einen Einfluß des Komplexons oder Zitrats auf die Fibrinfestigkeit auszuschließen, wurden die 3 Kuvetten des Thrombelastographen mit folgenden Mischungen gefüllt:

- 1) 0,25 ml thrombocytenarmes Plasma und 0,1 ml Komplexon (0,1%ig) + 0,05 ml 1/10 molare CaCl_2 .
- 2) 0,25 ml thrombocytenarmes Plasma + 0,1 ml einer 0,38%igen Natriumzitratlösung + 0,05 ml der 1/10 molaren CaCl_2 .
- 3) 0,25 ml thrombocytenarmes Plasma + 0,1 ml phys. NaCl + 0,05 CaCl_2 .

Komplexon m_e	Zitrat m_e	NaCl m_e
32	35	33
27	33	30
28	27	28

Wie die Tabelle zeigt, beeinflussen also weder Komplexon noch Zitrat die Fibrinfestigkeit.

Der "Fibrinfestigkeitsfaktor" war auch nach 5-8maligem Waschen der Thrombocyten unvermindert nachweisbar.

4) Eigenschaften des "Fibrinfestigkeitsfaktors"

a) Verdünnung

Die bisherigen Versuche wurden mit hohen Konzentrationen von Thrombocyten durchgeführt. Ausgehend von einer Konzentration von 10 Mill. Blutplättchen pro cmm wurden nun steigende Verdünnungen dieses Extraktes im TEG untersucht. Die Verdünnungen erfolgten mit phys.NaCl. Das Ergebnis dieser Untersuchungen zeigt die Abb.5. Die fibrinfestigkeitssteigende Wirkung war noch in einer Verdünnung von 1 : 20 nachzuweisen. Diese Verdünnung würde einer Thrombocytenzahl von 500 000 pro cmm entsprechen. Es ist darauf hinzuweisen, daß ein erheblicher Unterschied zwischen der fibrinfestigkeitssteigernden Wirkung von "lebenden" Thrombocyten und dem relativ geringen Einfluß des Plättchenextraktes auf die Fibrinfestigkeit besteht. Der gefundene Thrombocyteninhaltsstoff kann also nur einer von mehreren wirksamen Faktoren sein, die die "normale" Fibrinfestigkeit bedingen.

b) Abhängigkeit von den Plasmafaktoren

Der Extrakt aus Thrombocyten verbreiterte die Festigkeit von reinen Fibrinogenlösungen im TEG nicht. Nur zusammen mit einem oder mehreren Plasmafaktoren wird die Gerinnselfestigkeit erhöht.

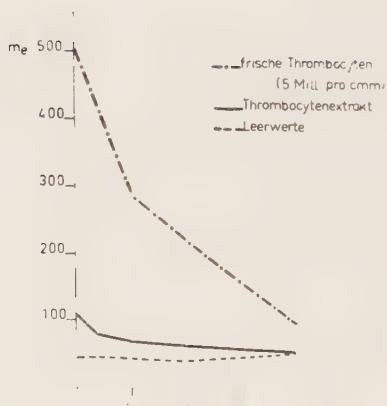


Abb. 5: Der Einfluß von Verdünnungen von Thrombocyten suspension und -extrakt auf die Fibrin festigkeit

Ansatz: 0,25 ml thrombocytenfreies Plasma
 0,05 ml CaCl_2 (1/10 mol)
 0,1 ml von Thrombocyten suspension (5 Mill. pro cmm). -.-.-.-.-
 Thrombocytenextrakt aus einer Thrombocyten suspension von etwa 10 Mill. pro cmm. _____
 phys. NaCl - - - - -

Ansatz	Plasma- Verdünnung	Kurvenbreite mm	m _e
1) 0,05 ml thrombocytenarmes Plasma 0,05 ml Thrombocytenextrakt 0,05 ml Thrombin (1 NIH pro ml) 0,05 ml Fibrinogenlösung (1%ig) 0,05 ml CaCl ₂ -Lösung (1/40 mol)	-	22	28
2) 0,05 ml phys. NaCl 0,05 ml Thrombocytenextrakt Thrombin, Fibrinogen u. CaCl ₂ wie oben	-	5	5
3) 0,05 ml thrombocytenarmes Plasma 0,05 ml phys. NaCl Thrombin, Fibrinogen u. CaCl ₂ wie oben	-	13	15
4) 0,05 ml thrombocytenarmes Plasma 0,05 ml Thrombocytenextrakt Thrombin, Fibrinogen u. CaCl ₂ wie oben	1 : 2	19	23
5) 0,05 ml thrombocytenarmes Plasma 0,05 ml Thrombocytenextrakt Thrombin, Fibrinogen u. CaCl ₂ wie oben	1 : 4	18	22
6) 0,05 ml thrombocytenarmes Plasma 0,05 ml Thrombocytenextrakt Thrombin, Fibrinogen u. CaCl ₂ wie oben	1 : 8	15	18
7) 0,05 ml thrombocytenarmes Plasma 0,05 ml Thrombocytenextrakt Thrombin, Fibrinogen u. CaCl ₂ wie oben	1 : 16	13	15

Dieses Ergebnis war zu erwarten, da die Notwendigkeit von Plasma-Cofaktoren für die normale Thrombocytenfunktion durch zahlreiche Untersuchungen gesichert ist.

c) Verhalten bei Ätherextraktion

2 ml des Plättchenextraktes wurden mit 2 ml Äthyl-äther 5 Min. lang geschüttelt, dann wurde die über-

stehende Ätherschicht in ein Röhrchen mit 2 ml phys. NaCl einpipettiert. Der ätherbehandelte Thrombocytenextrakt wurde 10 Min. lang bei 1000 g zentrifugiert. Dabei bildeten sich eine obere gelatineartige Schicht und eine untere wässrige Phase. Beide Schichten wurden getrennt und zusammen mit dem Ätherextrakt in den Exsiccator gebracht und der Äther vollständig abgesaugt.

Die Ätherschicht hatte keinen Einfluß auf die Fibrinfestigkeit und auf die Retraktion. Die beiden unteren Schichten verbreiterten die TEG-Kurve in der gleichen Weise wie der unbehandelte Thrombocytenextrakt. Mit ihnen war eine geringe Retraktion thrombocytenfreien Normalplasmas zu erzielen.

d) Temperaturabhängigkeit

Der Thrombocytenextrakt wurde 30 Min. lang auf 53, 75, 85 und 100° C erhitzt und danach sofort abgekühlt und auf seine Wirkung im TEG untersucht. (Siehe Abb. 6)

Bei 100° C, 30 Min. lang, wird die Wirkung der hämolysierten, ultrazentrifugierten Thrombocyten auf die Fibrinfestigkeit fast völlig zerstört. Nach Erhitzen auf 53° ist die volle Wirkung noch vorhanden.

e) Ph-Optimum

Zunächst wurde untersucht, bei welchem Ph-Wert die Fibrinfestigkeit ohne Thrombocytenextrakt oder Thrombocyten am größten war. Zu 0,175 ml thrombocytenarmen Plasma wurden 0,175 ml Michaelispuffer mit einem Ph von 7,6, 7,2, 6,8 sowie Sörensenpuffer mit einem Ph von 5,8 hinzugegeben. Das Gemisch wurde dann mit 0,05 ml CaCl_2 versetzt und im TEG getestet.

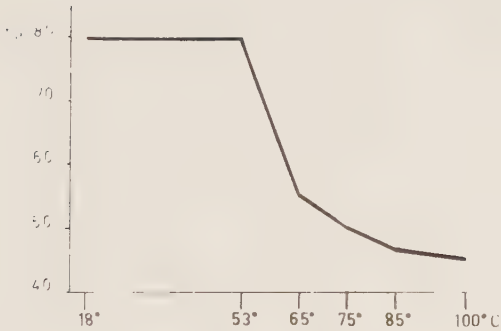


Abb. 6: Temperaturabhängigkeit des Fibrinfestigkeitsfaktors aus Thrombocyten. (Nach Erhitzen jeweils 30 Min. lang).

Ansatz: 0,1 ml Thrombocytenextrakt
0,25 ml thrombocytenfreies Plasma
0,05 ml CaCl_2 (1/10 mol)

PH	m _e
5,8	(gerinnt nicht)
6,8	22
7,2	18
7,6	19

Dies bestätigt die Ergebnisse von Hartert (1949).

Wurden zu 0,175 ml thrombocytenfreiem Plasma und 0,05 ml Plättchenextrakt 0,175 ml Sörensenpuffer (Ph 5,8) sowie Michaelispuffer (Ph 6,8, 7,2 und 7,6) hinzugefügt und das Gemisch im TEG untersucht, so wurden folgende Kurvenbreiten erzielt:

Ph	m _e
5,8	11
6,2	13
7,2	15
7,6	18

Wurden statt Puffer 0,175 ml phys. NaCl verwendet, so betrug der Ph des Gemisches 8 und die Kurvenbreite im TEG 14 m_e .

Das Ph-Optimum für den Fibrinfestigkeitsfaktor der Thrombocyten liegt also bei diesem Versuch bei einem Ph von 7,2 - 7,6.

f) Lagerungsstabilität

Der Plättchenextrakt und eine Thrombocyten suspension vergleichbarer Konzentration wurden bei $+ 4^{\circ} \text{C}$ aufbewahrt und in Abständen von 8 Tagen auf ihre Wirkung im TEG geprüft. Anfänglich war die Kurve mit Thrombocyten suspension um 20 bis 40 mm breiter als die Kurve mit Plättchenextrakt und 50 mm breiter als die des Leerversuches. Nach 8 Tagen entsprach die Kurvenbreite der Thrombocyten suspension den Werten, die mit dem Plättchenextrakt erzielt werden konnten. Bei späteren Versuchen änderten sich die gefundenen Werte nicht mehr. Nach 7-wöchiger Lagerung war die Fibrinfestigkeitszunahme, die mit den Thrombocytenextrakten an plättchenarmen Plasma erzielt werden konnte, ebenso nachweisbar wie am ersten Tag. Sie war genauso groß wie die der Thrombocyten suspension (siehe Abb. 7).

Der Fibrinfestigkeitsfaktor erwies sich somit als lagerungsstabil. Die Wirkung von unbehandelten Thrombocyten suspensionen auf die Thrombusfestigkeit ließ nach wenigen Stunden nach. Hierbei handelt es sich um den Verlust des sogenannten "Vitalfaktors". Wie später noch gezeigt wird, dürfte es sich bei diesem Verlust um das Verschwinden der Energie in Form von ATP handeln und außerdem um den zunehmenden Verlust der Strukturelemente, durch den Zerfall der Thrombocyten.

g) Ammonsulfatfüllung

Zu 2 ml gesättigter Ammonsulfatlösung wurden 2 ml Thrombocytenextrakt hinzugefügt. Nach 10 minütigem Zentrifugieren bei 1000 g wurde der weißliche Niederschlag in phys. NaCl aufgeschwemmt und so von dem

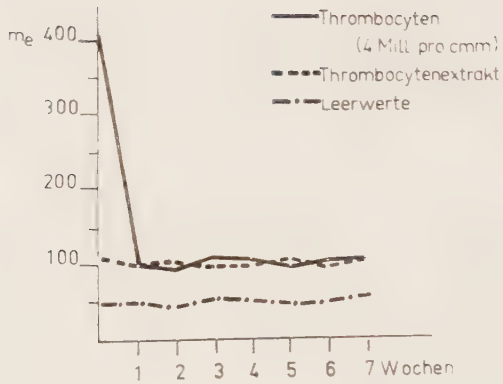


Abb. 7: Lagerungsstabilität des Fibrinfestigkeitsfaktors aus Thrombocyten

Ansatz: 0,25 ml thrombocytenfreies Plasma
 0,05 ml CaCl_2 (1/10 mol)
 0,1 ml Thrombocyten suspension
 oder Thrombocytenextrakt
 oder phys. NaCl

klaren Überstand getrennt. Beide Fraktionen wurden 12 Stunden lang gegen fließendes Wasser dialysiert, danach 2 Stunden gegen phys. NaCl. Die mit beiden Fraktionen erzielte Fibrinfestigkeit war geringer als die des Leerversuches. Das gleiche Ergebnis fand sich bei 33% Sättigung mit Ammonsulfat. Wurden Niederschlag und Überstand nach der Ammonsulfatfällung mit Michaelispuffer auf einen Ph von 7,6 gebracht, so entsprachen die damit gewonnenen TEG-Kurven den Leerversuchen. Der "Fibrinfestigkeitsfaktor" scheint somit mit Ammonsulfat fällbar zu sein, konnte jedoch nach der Fällung nicht mehr durch Dialyse wiedergewonnen werden.

h) Adsorbierbarkeit

1 ml Plättchenextrakt wurde mit einer Messerspitze des Adsorbtionsmittels versetzt, 5 Min. lang geschüttelt und 10 Min. bei 2000 g zentrifugiert und der Überstand im TEG geprüft. Nach der Adsorption mit Magnesiumhydroxyd, Kohle, Kaolin, Bariumcarbonat und Tricalciumphosphat entsprachen die TEG-Kurven denen, die mit unbehandelten Plättchenextrakt erzielt wurden. Mit Bariumsulfat behandelte Plättchenextrakte zeigten im TEG eine Verlängerung der Gerinnungszeit um 10 bis 30 Minuten. Die Kurven wurden jedoch genau so breit wie die von unbehandelten Plättchenextrakten.

Nach Behandlung mit Aluminiumhydroxyd war kein Unterschied gegenüber dem Leerversuch mehr festzustellen, d.h. der "Fibrinfestigkeitsfaktor" ist an Aluminiumhydroxyd adsorbierbar.

Zusammenfassend ergab sich, daß der "Fibrinfestigkeitsfaktor" nicht adsorbierbar ist an Magnesiumhydroxyd, Kohle, Kaolin, Bariumcarbonat und Tricalciumphosphat, daß er jedoch an Aluminiumhydroxyd adsorbiert werden kann.

i) Dialyse

Der Plättchenextrakt wurde 12 Stunden lang gegen fließendes Wasser dialysiert und anschließend 2 Stunden gegen phys. NaCl. Der so behandelte Plättchenextrakt zeigte im TEG noch die gleiche Wirkung auf die Fibrinfestigkeit wie der unbehandelte Extrakt. Der "Fibrinfestigkeitsfaktor" erwies sich somit als nicht dialysierbar.

k) Eiweißgehalt des Plättchenextraktes

In einem Plättchenextrakt, der aus einer Thrombocyten suspension von 8 Mill. pro cmm gewonnen war, fand sich ein Gesamteiweißwert von 0,75 g%.

Selbstverständlich enthält dieser Extrakt neben dem "Fibrinfestigkeitsfaktor" noch andere Eiweißkörper. Es kann bisher noch nichts über die tatsächliche Konzentration dieses Faktors gesagt werden.

l) Die Wirkung des Plättchenextraktes auf die Retraktion

Wie bereits zu Anfang ausgeführt wurde, bestehen im allgemeinen enge Beziehungen zwischen der Wirkung der Thrombocyten auf die Fibrinfestigkeit und auf die Retraktion. Dies gilt besonders für klinische Untersuchungen an intakten Thrombocyten.

Nach Hartert (1952) handelt es sich hierbei um Phänomene, die parallel laufen. Auch Benthaus (1959) ist dieser Auffassung. Er schreibt: "Die im TEG erkennbare größte Gerinnselfestigkeit geht mit der Plättchenzahl und der Retraktivität parallel. Die Gerinnselfestigung ist aber mit der Retraktion nicht identisch, son-

dern nur eine ihrer Begleiterscheinungen."

Marshall und Leroux (1957) halten die im TEG erkennbare und meßbare Fibrinfestigkeit für ein Maß der Retraktivität des Gerinnsels. Danach wäre eine analoge Wirkung der Plättchen bzw. ihrer Extrakte auf Fibrinfestigkeit und Retraktion zu erwarten.

Im Gegensatz dazu steht die Auffassung von J. Jürgens (1959): "Sehr wahrscheinlich dürfte das von den Thrombocyten abgegebene Retraktocym mit jenem Ferment, das die mechanische Festigkeit des gebildeten Thrombus wesentlich beeinflußt, nicht identisch sein." Wir haben nun folgende Versuche durchgeführt:

Die Retraktion wurde nach dem auf Seite 12 angegebenen Verfahren gemessen. Mit dem Extrakt aus hämolysierten Thrombocyten nach der Ultrazentrifugierung war bei zahlreichen Untersuchungen stets eine sehr geringe Retraktion gegenüber dem Leerversuch festzustellen. Diese Retraktion betrug nie mehr als 10 bis 20 % und, verglichen mit der Retraktion in Anwesenheit von intakten Thrombocyten von 75 bis 85 %, war sie gering. Zusammenfassend war also mit unseren Plättchenextrakten eine geringe Retraktion auszulösen. Auf Grund dieses Ergebnisses halten wir es doch für wahrscheinlich, daß der 'Fibrinfestigkeitsfaktor' auch eine Bedeutung für die normale Retraktion der Thrombocyten hat. Es ist uns bisher jedoch nicht gelungen, mit ATP die Wirkung des Plättchenextraktes auf die Retraktion zu steigern.

Mit einer Modifikation des Verfahrens nach Hirschböck (zitiert bei Gross und Mattis 1952) untersuchten wir, ob die Thrombocytenextrakte einen Einfluß auf die Retraktionszeit haben. Wir verwendeten folgende Versuchsanordnung:

Zu 1 ml Zitratblut wurden 0,2 ml phys. NaCl, 0,3 ml 1/10 mol. CaCl₂ zugegeben. Nach kurzem Schütteln wurde 1 Tropfen dieses Gemisches in 2ml Rizinusöl einpipetiert. Die Serumauspressung wurde am schwebenden Tropfen beobachtet. In der Regel trat sie 23 bis 25 Min. nach Eintritt der Gerinnung auf. Nach Zugabe des Fibrinfestigkeitsfaktors war die Retraktionszeit erheblich verlängert. Sie betrug 2 Stunden.

Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist jedoch schwer deutbar. Der Eintritt der Gerinnung kann in dem in Rizinus hängenden Tropfen nicht beobachtet werden. Es ist durchaus möglich, daß die Gerinnungszeit unter bestimmten Bedingungen, so beim Fehlen von Oberflächenkontakt, in dem in Rizinusöl hängenden Tropfen sehr viel später erfolgt als in dem Vergleichsröhrchen, auch wenn dieses silikonisiert ist. Es liegt nahe, einen Unterschied zwischen der Gerinnungszeit in dem Vergleichsröhrchen und dem in Rizinusöl eingebrachten Tropfen zu vermuten. Die schnellere Gerinnung in dem Vergleichsröhrchen ist dabei wohl auf den Kontakt mit der Glasoberfläche zurückzuführen. Da die Retraktionszeitmessung eine mit Recht sehr umstrittene Methode ist, wurde dem beobachteten Phänomen nicht weiter nachgegangen.

6) Abtrennung von den bekannten Plättchenfaktoren:

a) Plättchenfaktor 1

Wir untersuchten die Plättchenextrakte auf ihren Gehalt an Plättchenfaktor 1 - 4.

Nach den Untersuchungen von Deutsch, Johnson und See-
gers (1955) findet sich nach der Ultrazentrifugation wässriger Extrakte aus homogenisierten Thrombocyten der Faktor 2 in der obersten Schicht, der Faktor 4 in der Bodenschicht und der Faktor 1 mit Resten von Faktor 3 im Sediment.

R. Jürgens (1952) hat Plättchenextrakte bei 120 000 g 20 Min. lang ultrazentrifugiert und fand im Überstand eine Plättchenfaktor 2- und Antiheparinwirkung. Diese Plättchenfaktor 4- Wirkung war jedoch nach 14-tägiger Lagerung nicht mehr nachweisbar. Im Sediment fand er Plättchenfaktor 3. Das Ergebnis seiner Untersuchungen entspricht etwa dem von Deutsch, Johnson und Seegers.

Der Plättchenfaktor 1 beschleunigt die Umwandlung von Prothrombin in Thrombin und zeigte schon bei seiner Entdeckung durch Ware, Fahey und Seegers (1948) weitgehende Ähnlichkeiten mit dem Plasmafaktor V. Trotz der noch nicht völlig geklärten Unterschiede in der Lagerungsstabilität wird heute von der Mehrzahl der Untersucher angenommen, daß der Plättchenfaktor 1 mit dem Plasmafaktor V identisch ist und daß es sich bei der Plättchenfaktor 1- Wirkung um den Einfluß von sehr intensivem, an die Plättchenoberfläche angelagertem Plasmafaktor V handelt. Für die eigenen Untersuchungen verwendeten wir die Methode zur Faktor 1- Bestimmung mit Faktor V freiem Plasma (J. Jürgens (1959)). In den Plättchenextrakten war regelmäßig eine Faktor 1-Wirkung nachzuweisen. Wurde der Plättchenextrakt mit Magnesiumhydroxyd behandelt, so verschwand die Plättchenfaktor 1-Wirkung. Der "Fibrin-festigkeitsfaktor" war nach der Adsorption jedoch unverändert nachzuweisen.

Nach den Angaben von Deutsch, Johnson und Seegers (1955) wäre zu erwarten gewesen, daß der Faktor 1 nach der Ultrazentrifugation bei 105 000 g sich im Sediment befunden hätte. Dieses Ergebnis konnten wir nicht bestätigen.

Die schon häufig beschriebene auffällige Lagerungsstabilität des Plättchenfaktors 1 konnten auch wir bei unseren Untersuchungen feststellen. Auch nach mehrwöchiger Lagerung war der Faktor 1 noch deutlich in den untersuch-

ten Thrombocytenextrakten nachzuweisen.

b) Plättchenfaktor 2

Der Plättchenfaktor 2 wurde ebenfalls 1948 von Ware, Fahey und Seegers entdeckt. Diese Autoren fanden, daß die Gerinnungszeit einer mit Thrombin versetzten Fibrinogenlösung durch Zugabe eines Thrombocytenextraktes von 15,8 auf 11 Sekunden verringert wurde. Van Crefeld und Paulssen zeigten 1951, daß der Plättchenfaktor 2 an Bariumsulfat und Magnesiumhydroxyd adsorbiert wird. (Lüscher (1959)). Bei unseren Untersuchungen ergab sich bei Verwendung einer 1%igen Fibrinogenlösung, die mit phys. NaCl und Thrombin (20 NIH in 15mal aqua dest.) versetzt wurde, eine Gerinnungszeit von 24,8 Sekunden. Bei Ersatz der phys. NaCl durch Thrombocytenextrakt wurde die Gerinnungszeit auf 39,6 Sek. verlängert. Auf diese Weise war also in unseren Extrakten eine Faktor 2-Wirkung nicht nachweisbar. Als zweite Untersuchungsmethode verwendeten wir nach J. Jürgens (1959) die Messung der Gerinnungszeit von Thrombocyten-freiem Normalplasma nach Thrombinzugabe. 0,1 ml thrombocytenarmes Normalplasma plus 0,1 ml phys. NaCl plus 0,1 ml einer Thrombinlösung (0,4 Einheiten pro ml) ergaben eine Gerinnungszeit von 55,9 Sek. Wurde statt der phys. NaCl Thrombocytenextrakt verwendet, so betrug die Gerinnungszeit 83,2 Sek.. Auch auf diese Weise war also keine Plättchenfaktor 2-Wirkung nachweisbar.

Nach Djerassi, Klein und Lauris (1958) bringt jedoch eine zu große Menge Plättchenmaterials in einem Gerinnungsansatz die Faktor 2-Aktivität zum Verschwinden und wirkt in noch größeren Konzentrationen hemmend.

Daher verdünnten wir unseren Plättchenextrakt. Bei einer Verdünnung von 1 Teil Plättchenextrakt mit 9 Teilen phys. NaCl verkürzte der Extrakt die Gerinnungszeit um 7 Sek. (von 42 Sek. auf 35 Sek.). Eine geringe Plättchenfaktor - 2 Aktivität war somit in unseren Extrakten ebenfalls nachweisbar.

Wurde der Plättchenextrakt mit Bariumsulfat oder Magnesiumhydroxyd (Lüscher 1959) ausgeschüttelt, so zeigte der so behandelte Extrakt keine Faktor 2-Wirkung mehr, der Fibrinfestigkeitsfaktor war jedoch unvermindert erhalten.

c) Plättchenfaktor 3

Der Thrombocytenfaktor 3 wird auch als Thrombocytenfaktor der Blutthrombokinasen bezeichnet. Es handelt sich bei diesem Faktor um ein Lipoprotein. Der Plättchenfaktor 3 wird bei hochtourigem Zentrifugieren in der Ultrazentrifuge sedimentiert (Deutsch, Johnson und Seegers 1955, R. Jürgens 1952 und Lüscher 1952). Wurde der Thrombokinasenbildungstest ausgeführt mit hämolysierten Thrombocyten, so wurde nach 10-minütiger Aktivierungszeit eine maximale Aktivität von 19 Sek. erzielt. Wurde bei diesem Test der Plättchenfaktor 3 (enthalten in hämolysierten Thrombocyten der Firma Hoffmann-la Roche, Grenzach) durch unseren Thrombocytenextrakt ersetzt, so wurden erst nach 16 Min. Aktivierung des Ansatzes Gerinnungszeiten von 30 Sek. erzielt. Eine wesentliche Faktor 3-Wirkung ist somit in den von uns verwendeten Extrakten nicht nachweisbar, vielmehr findet sich der Plättchenfaktor 3 hochaktiv im Sediment des ultrazentrifugierten Plättchenextraktes.

Auch Plättchenfaktor 3 ist gegenüber dem Fibrinfestigkeitsfaktor deutlich abzugrenzen.

d) Plättchenfaktor 4

Der Heparin-neutralisierende Faktor der Thrombocyten wurde 1951 von Crefeld und Paulssen untersucht. R. Jürgens (1952) fand den Plättchenfaktor 4 nach Ultrazentrifugieren (20 Min. bei 120 000 g) in der überstehenden Lösung. Bezüglich der Hitzeempfindlichkeit dieses Faktors sind die Angaben in der Literatur unterschiedlich. Nach R. Jürgens (1952) wird er durch 30-minütiges Erwärmen auf 53° nicht beeinflusst, während er nach Deutsch, Warwersich und Franke (1956) nach 30 Min. erwärmen auf 50° C völlig zerstört wird.

Die eigenen Untersuchungen wurden an folgendem Ansatz durchgeführt:

0,25 ml thrombocytenfreies Plasma

0,05 ml Liquemin (Verdünnung 1 : 1000, 5 Einheiten pro ml)

0,05 ml phys. NaCl

0,05 ml CaCl₂ (1/10 mol.)

Diese Mischung wurde im TEG getestet. Die Gerinnungszeit betrug dabei mehrere Stunden. Wurde die phys. NaCl durch Thrombocyten (15 Mill. pro cmm) ersetzt, so gerann der Ansatz nach 5-10 Minuten. Wurde die phys. NaCl durch unseren Plättchenextrakt ersetzt, so ergab sich eine Gerinnungszeit von 8-12 Minuten.

Die hämolysierten, ultrazentrifugierten Thrombocyten zeigten also deutlich eine Antiheparinwirkung, die allerdings etwas schwächer erschien als die "lebender" Thrombocyten.

Durch 30 Min. langes Erhitzen auf 60° C ging die Antiheparinaktivität bei unseren Untersuchungen nicht verloren. Dieses Ergebnis entspricht den Angaben von R. Jürgens (1952)

Im Gegensatz zu den Beobachtungen von R. Jürgens konnten wir jedoch die Antiheparinwirkung auch noch nach 14-tägiger Lagerung in unseren Extrakten nachweisen. Erst nach 7 Wochen Lagerung war praktisch keine Plättchenfaktor 4-Wirkung mehr nachweisbar, während der Einfluß auf die Fibrinfestigkeit unvermindert erhalten blieb. Der Plättchenfaktor 4 ist somit nicht identisch mit dem "Fibrinfestigkeitsfaktor".

e) Platelet-Cothromboplastin

Lee, Johnson und Seegers (1957) zerstörten Thrombocyten durch mechanisches Homogenisieren und durch Behandlung mit Ultraschall. Auf diese Weise stellten sie einen Thrombocytenextrakt her, aus dem sie einen Faktor isolierten, der die Fähigkeit der Lungenextraktthrombokinasen, gereinigtes Prothrombin in Biothrombin umzuwandeln, erhöhte. Sie nannten diesen Faktor Platelet-Cothromboplastin (Plättchen-Cothromboplastin). Sie vermuteten, daß das Plättchen-Cothromboplastin mit dem Faktor VII identisch sei. Eine direkte Wiederholung der Untersuchungen der genannten Autoren war uns nicht möglich, da uns gereinigtes Prothrombin nicht zur Verfügung stand. Lee, Johnson und Seegers fanden, daß die Zugabe des Plättchen-Cothromboplastins zu Prothrombin, Calcium, Acceleratorglobulin (Faktor V) und Russel-Viperngift die Menge Thrombin, die aus Prothrombin gebildet wurde, auf das 6-fache vermehrte und die Umwandlung entsprechend beschleunigte.

Einen Nachweis des Plättchen-Cothromboplastins versuchten wir auf folgende Weise zu erbringen:

Prüfungen im Thrombokinasebildungstest:
Durchführung dieses Testes nach Biggs (1953), Verwendung von 1 : 10 verdünntem Plasma, das mit Aluminiumhydroxyd ausgeschüttelt worden war, gealtertem 1 : 15 verdünntem Serum und dem von der Firma Hoffmann-La Roche zur Verfügung gestelltem Plättchenfaktor 3-Reagenz. Der Test wurde so durchgeführt, daß von dem vorbehandeltem Plasma 0,4 ml mit 0,4 des Serums, und 0,4 ml des Plättchenfaktor 3-Reagenz von Roche zusammengegeben wurden. Außerdem fügten wir 0,2 ml phys. NaCl zu jedem Ansatz hinzu. Nach Zugabe von 0,4 ml CaCl_2 (1/40 mol.) wurde nach jeweils 1 Minute 0,1 ml dieses Gemisches zusammen mit 0,1 ml einer 1/40 mol. CaCl_2 -Lösung zu 0,1 ml normalem Substratplasma hinzugesetzt und die Gerinnungszeit gestoppt. Die Gerinnungszeiten erreichten nach 12 Minuten ein Minimum von 17,5 Sek. wurde statt der phys. NaCl unser Plättchenextrakt zu dem Ansatz gegeben, so wurde nach 8 Min. eine maximale Aktivität mit 12,5 Sek. erzielt. (Siehe Abb. 8)

Wie bereits gesagt, enthält unser Plättchenextrakt keine Faktor 3-Wirkung mehr. Die von uns jetzt beobachtete Verkürzung der Aktivierungszeit läßt vermuten, daß in unseren Thrombocytenextrakten noch Plättchen-Cothromboplastin enthalten ist.

Diese Plättchen-Cothromboplastinaktivität konnte nicht von dem "Fibrinfestigkeitsfaktor" abgetrennt werden.

f) Clottable factor

Besonders auf Grund der Arbeiten von Lüscher (1959) ist bekannt, daß die Thrombocyten Fibrinogen enthalten, von dem noch nicht völlig klar ist, ob es sich lediglich um adsorbiertes Plasmafibrinogen handelt oder um umgewandeltes Fibrinogen in den Thrombocyten selbst. Das Thrombocytenfibrinogen ist hitzestabiler als das Plasmafibrinogen.

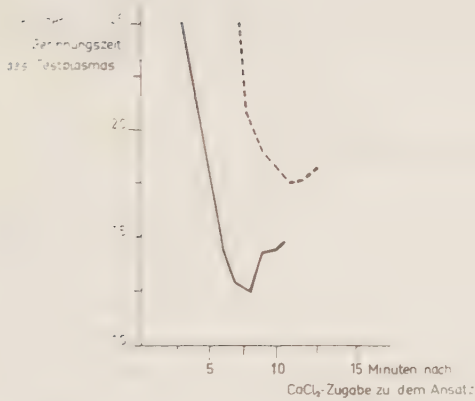


Abb. 8: Die Wirkung des Plättchenextraktes im
Thrombokinasebildungstest

_____ mit Plättchenextrakt - - - - ohne Plättchen-
extrakt

Beide Ansätze mit lyophilisiertem Plättchenmaterial
(Reagens Roche)

Um auszuschließen, daß es sich bei dem "Fibrinfestigkeitsfaktor" um Fibrinogen handelt, versetzten wir den Plättchenextrakt mit Thrombin. Dabei kam es zur Ausfällung einer relativ geringen Fibrinmenge. Der "Fibrinfestigkeitsfaktor" war nach dieser Fällung mit Thrombin im TEG in der gleichen Weise nachweisbar wie zuvor.

g) Fibrinstabilisierender Faktor

Der "Fibrinstabilisierende Faktor" kommt nach Lüscher (1959) in den Thrombocyten in höherer Konzentration vor als im Plasma, wo er zuerst von Laki und Lorand (1948) nachgewiesen wurde. Es handelt sich um eine Substanz, die unter Thrombineinwirkung entstandenes Fibrin so stabilisiert, daß sich das Gerinnsel in 5 molarer Harnstofflösung nicht mehr löst (Lüscher 1959).

Um zu untersuchen, ob sich dieser Faktor auch in unserem Plättchenextrakt befindet, wurde folgender Versuch ausgeführt:

0,2 ml 1%iges Fibrinogen mit 0,2 ml Thrombin (20 NIH in 5 ml aqua dest.) mit 0,2 ml phys. NaCl zur Gerinnung gebracht. Das Gerinnsel wurde mit einer Pinzette entnommen und in 5 molarer Harnstofflösung innerhalb 2 Minuten zur Auflösung gebracht.

Wurde die phys. NaCl durch unseren Plättchenextrakt ersetzt, so war das Gerinnsel nach 24 Stunden noch vorhanden.

In unseren Plättchenextrakten ist also auch der "Fibrinstabilisierende Faktor" nachzuweisen.

Auf Grund unserer Untersuchungen ließ sich der "Fibrinfestigkeitsfaktor" abtrennen von den Plättchenfaktoren 1-4 und von dem Clottable-Factor der Thrombocyten, der vermutlich mit Fibrinogen identisch ist. Nicht abzutrennen war das Plättchen-Cothromboplastin und der "Fibrinstabilisierende Faktor".

E. Diskussion

Wir fanden eine noch nicht beschriebene Wirkung von Thrombocytenextrakten, nämlich ihren Einfluß auf die Fibrinfestigkeit eines thrombocytenfreien Plasmas im TEG.

Dieser Einfluß von Plättchenextrakten, der sich sowohl mit Schweinethrombocyten als auch mit menschlichen Blutplättchen nachweisen ließ, konnte von der Wirkung der Plättchenfaktoren 1-4 und der des Clottable-Factors abgetrennt werden. Eine Identität mit dem von Lee, Johnson und Seegers (1957) beschriebenen Plättchen-Cothromboplastin ist unwahrscheinlich.

Es handelt sich wohl um ein Protein. Auf Grund der Untersuchungen mit der Flotationstechnik in der Ultrazentrifuge und den Extraktionsversuchen mit Äther ist es unwahrscheinlich, daß es sich um ein Lipid oder um ein Lipoprotein handelt. Vermutlich ist das Molekulargewicht des "Fibrinfestigkeitsfaktors" nicht sehr hoch, da er durch dauerndes Ultrazentrifugieren bei 100 000 g nicht sedimentiert wird.

Es gelang, mit den gleichen Plättchenextrakten eine geringe Retraktion eines thrombocytenfreien Plasmas zu erzielen. Vielleicht ist diese Wirkung von Plättchenextrakten auf die Fibrinfestigkeit und auf die Retraktion mit dem schon seit Jahrzehnten postulierten hypothetischen Retraktozym der Blutplättchen zu erklären. Für diese Frage war die Veröffentlichung von Lüscher (1959) über die Entdeckung eines kontraktilen Proteins der Thrombocyten, welches zusammen mit ATP eine spontane Kontraktion zeigte, von besonderem Interesse. Wir halten es für sehr wahr-

scheinlich, daß die von uns gefundene Wirkung auf die Fibrinfestigkeit im TEG auf dieses kontraktile Protein der Thrombocyten zurückzuführen ist. Es lag nahe zu prüfen, ob sich die Wirkung des Plättchenextraktes durch Zugabe von ATP steigern läßt. Dies ist, wie die folgende Tabelle zeigt, möglich:

m_e von ATP + Fibrin- f-stigkeitsfaktor	m_e von Fibrin- festigkeits- faktor	m_e des zugehörigen Leerwertes
133	92	49
56	45	33
113	92	47
ATP-Endkonzentration 1/100 mol.		

Mit Plättchenextrakt und ATP gelang es also, eine relativ große Gerinnselfestigkeit des thrombocytenfreien Plasmas zu erzielen. Die benötigten Mengen des Plättchenextraktes und des ATP überstiegen allerdings die Mengen, die in normalen Thrombocyten vorhanden sein dürften. Es besteht also eine immer noch erhebliche Differenz zwischen der Wirkung von Plättchenextrakt plus ATP und dem Einfluß "lebender" Thrombocyten auf Fibrinfestigkeit und Retraktion. Dies läßt sich vielleicht folgendermaßen erklären:

Normale Thrombocyten geben wahrscheinlich während der Gerinnung den "Fibrinfestigkeitsfaktor" ab, der vermutlich mit dem kontraktilen Protein der Thrombocyten identisch ist. Gleichzeitig steht in den Blutplättchen Energie in Form von ATP zur Verfügung. Mit Hilfe dieser Energie beeinflußt der "Fibrinfestig-

keitsfaktor" die Gerinnselfestigkeit dadurch, daß das Fibrinmolekül verändert wird (vielleicht im Sinne der Untersuchungen von Bailey, Astbury und Rudall (1943) durch die Existenz von Beta- und Alpha-Formen des Fibrins, wie sie auch Lüscher für möglich hält.) Diese Umwandlung erfolgt wahrscheinlich in erster Linie in der unmittelbaren Nachbarschaft der einzelnen Thrombocyten, wo "Fibrinselfestigkeitsfaktor" und ATP konzentriert zur Verfügung stehen. Verstärkt wird die Wirkung dieser Faktoren auch durch Oberflächenkräfte der Thrombocyten. Hierdurch wäre erklärt, weshalb es nicht gelingt, mit dem Plättchenextrakt und ATP eine maximale Retraktion und Fibrinselfestigkeit zu erzielen. Bei diesen experimentellen Bedingungen fehlen der Oberflächenfaktor und das Konzentrationsgefälle des "Fibrinselfestigkeitsfaktors" plus ATP, denn der "Fibrinselfestigkeitsfaktor" ist bei unseren Versuchen in dem Testplasma gleichmäßig verteilt, während "lebende" Thrombocyten diese Substanz und ATP in ihrer unmittelbaren Nähe konzentriert abgeben. Hier ist auch auf die Arbeiten von Hartert (1952) und Benthaus (1959) hinzuweisen. Hartert erklärt die Retraktion mit der Erweichung des Fibrins durch ein Ferment (Thromboglutin), das aus den Thrombocyten frei wird, während Benthaus die Retraktion in erster Linie auf Oberflächenkräfte der Thrombocyten zurückführt. Allerdings müssen wir bezüglich der Retraktion einschränkend bemerken, daß es uns bisher nicht gelang, mit ATP die Wirkung des Plättchenextraktes auf die Retraktion zu steigern. Es ist möglich, daß es sich hierbei noch um methodische Schwierigkeiten bei unseren Versuchen gehandelt hat.

In Bestätigung zahlreicher Untersuchungen der vergangenen Jahre halten wir es für wahrscheinlich, daß Retraktion und Fibrinselfestigkeit an das Vorhandensein intakter Thrombocyten gebunden sind. Die Auf-

gabe der Plättchen dabei ist eine dreifache.

- 1) Die Abgabe des Fibrinfestigkeitsfaktors, der wahrscheinlich mit dem kontraktilen Protein identisch ist.
- 2) Die Abgabe von Zellenergie in Form von ATP.
- 3) Die Steigerung der Wirkung auf das Fibrinnetz durch Oberflächenfaktoren.

Auf Grund der Untersuchungen von Bergsagel, Fonio und Schwendener (1942) ist es wahrscheinlich, daß die Freisetzung der Thrombocyteninhaltsstoffe während der viskösen Metamorphose der Plättchen erfolgt. Daß die visköse Metamorphose durch Thrombinspuren ausgelöst wird, ist von Quick 1951 schon festgestellt worden. Lüscher (1956) nahm an, daß die visköse Metamorphose vom Austritt einer viskösen Substanz, dem sogenannten Protein - S, gefolgt sei. Dieses Protein - S konnte Lüscher in seinen letzten Arbeiten als ein dem Aktomyosin der Muskelzellen ähnliches kontraktils Protein beschreiben (Lüscher 1959). Wir nehmen an, daß dieses kontraktile Protein für die von uns gefundene Wirkung von Plättchenextrakten auf die Fibrinfestigkeit im TEG verantwortlich ist.

Welche physiologische Bedeutung der "Fibrinfestigkeitsfaktor" hat, ist zunächst nur zu vermuten. Es scheint möglich, daß dieser Mechanismus eine entscheidende Bedeutung für die normale Abdichtung der Gefäße im Organismus hat. Es ist schon lange bekannt, daß beim Fehlen von Blutplättchen eine allgemeine Kapillardurchlässigkeit auftritt, die sich klinisch zunächst besonders in der Neigung zu Blutungen in Form von petechialen Herden und in einer allgemeinen hämorrhagischen Diathese äußert. Das

gleiche Erscheinungsbild findet sich bei den sogenannten Thrombopathien, bei denen Störungen der Retraktion und der Thrombusfestigkeit im TEG gefunden werden, die mit den klinischen Erscheinungen meist parallel gehen. Wir möchten vermuten, (wie es schon Lüscher (1959) angenommen hat), daß bei der normalen Gefäßabdichtung die Thrombocyten die Quelle des sogenannten Interzellulär-Zementes (Chambers und Zweifach 1947) sind. Es erscheint möglich, daß der "Fibrinfestigkeitsfaktor" bzw. das kontraktile Protein eine wesentliche Rolle bei der Bildung dieses Interzellulär-Zementes spielt, oder sogar den Interzellulär-Zement selbst darstellt. Es ist allerdings auch zu erwägen, ob es sich bei diesem Interzellulär-Zement um ein besonderes Fibrin handelt, welches erst unter der Einwirkung der aus den Plättchen frei werdenden kontraktilen Substanzen entsteht. Diese Fragen werden erst durch weitere Untersuchungen, insbesondere am lebenden Tier, zu klären sein. Doch ist hier schon auf die zuletzt wieder von Lüscher (1959) zitierte Beobachtung von Baumgartner (1956) hinzuweisen, daß Fibrinablagerungen allein für die Funktionstüchtigkeit der Gefäße nicht verantwortlich sein dürften, da die erhöhte Fragilität der Gefäße ein typisches Merkmal der Thrombopenie und Thrombasthenie, nicht aber der Afibrinogenämie ist.

Unsere Untersuchungen bestätigen somit weitgehend die Auffassungen und Untersuchungsergebnisse von Lüscher. Darüberhinaus gelang es uns, experimentell eine der "Vitalfunktionen der Thrombocyten", nämlich die Wirkung auf die Fibrinfestigkeit im TEG weitgehend durch einen Plättchenextrakt und ATP zu ersetzen. Weitere Untersuchungen zur Klärung des

Retraktionsvorganges sind noch erforderlich. Vermutlich liegt der Wirkung der Thrombocyten auf Fibrinfestigkeit und Retraktion das gleiche Prinzip zu Grunde. Von besonderem Interesse dürfte es sein, Patienten mit Thrombopathien, insbesondere auch Lebercirrhosen, mit den Erscheinungen einer Thrombopathie, zu untersuchen und zu prüfen, ob bei ihnen ein Mangel an "Fibrinfestigkeitsfaktor" oder an ATP nachgewiesen werden kann.

F. Zusammenfassung

Wir fanden in zellfreien Plättchenextrakten aus menschlichen sowie auch aus Schweinethrombocyten einen Faktor, der die Fibrinfestigkeit eines thrombocytenarmen Plasmas im TEG deutlich erhöhte. Diese Wirkung ließ sich durch den Zusatz von Adenosin-triphosphat (ATP) weiter steigern.

Dieser "Fibrinfestigkeitsfaktor" konnte von den bekannten Plättchenfaktoren zum Teil abgetrennt werden:

Plättchenfaktor 1 war in unseren Extrakten nachweisbar und konnte durch Adsorbierung mit Magnesiumhydroxyd abgetrennt werden. Plättchenfaktor 2 konnten wir in unseren Thrombocytenextrakten nachweisen und ebenfalls von dem "Fibrinfestigkeitsfaktor" abtrennen. Plättchenfaktor 3 war nicht mehr in dem ultrazentrifugiertem Extrakt nachzuweisen, fand sich jedoch hochkonzentriert im Sediment. Plättchenfaktor 4 war in den frischen Extrakten vorhanden, nach 7-wöchiger Lagerung jedoch vollständig verschwunden.

Der "clottable" Faktor der Thrombocyten konnte durch Zugabe von Thrombin zu den Extrakten ausgefällt werden ohne Beeinträchtigung der Wirkung des "Fibrinfestigkeitsfaktors". Die Plättchen-Cothromboplastinwirkung konnte in den Extrakten wahrscheinlich gemacht werden, eine Abtrennung dieses Faktors gelang noch nicht.

Nach Lagerung bei + 4° C blieb die Wirksamkeit des "Fibrinfestigkeitsfaktors" mindestens 8 Wochen erhalten. Ph-Optimum bei 7,6. Weitere Eigenschaften des von uns gefundenen Faktors sind:

Nicht mit Äther extrahierbar, adsorbierbar an Aluminiumhydroxyd, nicht adsorbierbar an Kohle, Kaolin, Bariumsulfat und Tricalciumphosphat. Keine Beeinflussung durch 30-minütiges Erhitzen auf 53° C, Verminderung nach 30-minütigem Erhitzen auf 75° C, fast vollständige Zerstörung nach 30 Minuten bei 100° C.

Wir halten es für wahrscheinlich, daß die Wirkung unserer Plättchenextrakte im TEG durch das von Lüscher (1959) beschriebene kontraktile Protein hervorgerufen wird und daß dieser Eiweißkörper mit dem von uns gefundenen Faktor identisch ist. Mit Lüscher glauben wir, daß die Wirkung der Thrombocyten auf die Fibrinfestigkeit im TEG und wohl auch auf die Retraktion durch diesen mit dem kontraktilen Protein wahrscheinlich identischen Faktor unter dem Einfluß von ATP zustande kommt. Die Tatsache, daß der Einfluß der Plättchenextrakte plus ATP immer noch weit hinter der Wirkung intakter Thrombocyten zurückbleibt, erklärt sich unseres Erachtens aus der Oberflächenwirkung der Thrombocyten, die bei den zellfreien Extrakten fehlt.

G. Literatur-Verzeichnis

- Bailey, K., Astbury, W.T. and Rudall, K.M. Fibrinogen and Fibrin as members of the keratin-myosin group. Nature (London) 151, 716 (1943)
- Ballerini, G. 5-OH-triptamina e retrazione del coagulo. Progr.med.(Napoli) 11, 455 (1955)
- Baumgartner, W. Klinische Demonstrationen. Helv.med.Acta 23, 311 (1956)
- Benthaus, J. Über die Retraktion des Blutgerinnsels. Thromb.Diath.haem. 2/3, 147(1959)
- Bergsagel, D.E. Viscous metamorphosis of blood platelets: Morphological platelet-changes induced by an intermediate product of blood thromboplastin. Brit.J.Haemat.2, 130 (1956)
- Biggs, R. and Douglas, A.S. The thromboplastin generation test. J.clin.Path. 6, 23 (1953)
- Bounameaux, Y. Recherches sur le mécanisme de la rétraction du caillot et de la métamorphose visqueuse des plaquettes. Experimentia (Basel) 12, 355 (1956)
- Breddin, K. Blutgerinnungsstörungen bei Lebererkrankungen unter besonderer Berücksichtigung der Thrombocytenfunktion. In Vorbereitung (1960)
- Bucher, U. Messung und Bewertung der Retraktion des Blutgerinnsels. Praxis 18, 406 (1956)

- Chambers, R. und
Zweifach, B.W. Interzellular cement and capillary permeability.
Physiol. Rev. 27, 436 (1947)
- Grefeld, S. van and
Paulssen, M.M.P. Significance of clotting factors in blood platelets in normal and pathological conditions.
Lancet II, 242 (1951)
- De Mattis, F. und
Vulpis, N. The influence of blood corpuscles on the clot firmness:
Thrombelastographic observations.
Thromb. Diath. haem. 1, 1 (1959)
- Djerassi, I., Klein, E.
and Lauris, V. Human platelet material and thrombin activity. Proc. 8. Congr. Int. soc. Hematol. Boston 55 (1956)
- Deutsch, E. Blutgerinnungsfaktoren.
Franz Deuticke Verlag, Wien, (1955)
- Deutsch, E. Johnson
und Seegers, W.H. Differentiation of certain platelet factors related to blood coagulation.
Circulat. Res. 3, 110 (1955)
- Deutsch, E. und
Martiny, K. The Influence of Serotonin on Clot Retraction and the Thrombelastogramm.
Thromb. Diath. hem. 2, 1/2 (1958)
- Deutsch, E. Warwersich
und Franke, G. The relation of different platelet factors to brain thromboplastin.
Proc. 6. congr. Int. Soc. Haematol., Boston 477 (1956)
- Feissly, R.
Lüdin, H. Thrombocytenzählung.
Rev. Hematol. 4, 481 (1948)

- Fenichel, R.L. und Seegers, W.H. Bovine Platelets, serotonin and the retraction of human plasma clots. Amer.J. Physiol. 181, 19 (1955)
- Fonion, A. und Schwendener, J. Die Thrombocyten des menschlichen Blutes. Berlin 1942
- Fonio, A. Über die Wirkung des Hyalomers der Thrombocyten auf den Retraktionsvorgang. Acta haemat.(Basel) 8 363 (1952)
- Fonio, A. Über die 3. Phase des Blutgerinnungsmechanismus und über die Funktion der Strukturelemente der Thrombocyten Ergebnisse inn. Med.N.F.IV 1 (1953)
- Fonion, A. Über den Aufbau und die Retraktion des Fibringerinnsels in physiol. und pathologischer Beziehung. Schweiz.Med.Wschr.84, 785 (1954)
- Glanzmann, E. Hereditäre, hämorrhagische Thrombasthenie. Jb. Kinderheilk. 88, 113 (1918)
- Gofmann, M. zitiert bei F. Wuhrmann, C.Wunderly. Die Bluteiweißkörper des Menschen. Benno Schwabe u. Co. Verlag, Basel, Stuttgart S. 138 (1957)
- Gross, R. und Mattis, P. Die Retraktion des Blutkuchens und ihre Störungen (Untersuchungen über die Retraktionszeit) Zeitschr.f. klin. Med. Bd. 150 13-27 (1952)
- Gross, R. und Stauffenberg, E. Über den Einfluß von 5-Hydroxytryptamin (Serotonin) 5-Hydroxytryptophan und von Serotoninantagonisten auf die Retraktion von Blutgerinnseln. Thromb. Diath.haem. 2, 1/2 (1958)
- Hartert, H. Thrombelastographische Untersuchungen zur Thrombusbildung.Klin.Wschr.789(1949)
- Hartert, H. Klinische Blutgerinnungsstudien mit der Thrombelastographie.Dtsch.Arch.klin.Med. 199, 284 (1952)

- Hartert, H. Ein Retraktions-Cofaktor im Serum. Klin.Wschr. 139 (1954)
- Hartert, H. Zur thrombelastographischen Kontrolle der Thromboembolieprophylaxe und Therapie. Ztschr.f.klin.Med. 153, 423(1955)
- Hartert, H., Lasch, H.G. und Pfisterer Charakterisierung und Funktion eines Retraktions-Cofaktors. Thromb.Diath.haem. 1, 445 (1957)
- Savitzky, W. Platelet Adhesiveness and Clot-Retraktion Time. Am.J.clin.pathol. 22, 1175 (1952)
- Introzzi, P. und de Nicola, P. Untersuchungen über die Physiopathologie der Blutplättchen. Scienta. Med.Ital. IV, 1, 697 (1955)
- Jürgens, J. Klinische Methoden der Blutgerinnungsanalysen. Thieme-Verlag Stuttgart, 5912 S. (1959)
- Jürgens, R. Die Blutplättchen und ihre Bedeutung für Blutungsneigung und Thrombusbildung. Dtsch.med.Wschr. 1265 (1952)
- Laki, K. and Lorand, L. On the stability of fibrin clots. Science 108, 280 (1948)
- Lee, Ch.-Y., Johnson, S.A. and Seegers, W.H. Platelet cothromboplastin: A platelet factor related to the blood clotting mechanism. Thromb.Diath.haem. 1, 16 (1957)
- Le Sourd, et Pagniez, P. Du rôle des hémato blasts dans la rétraction du caillot. C.R. Soc. Biol. (Paris) 61, 109 (1906)

- Lüscher, E.F. Viscous metamorphosis and clot retraction. *Vox Sang.* (Basel) 1, 133 (1956)
- Lüscher, E.F. Glukose als Cofaktor bei der Retraktion des Blutgerinnens. *Experientia* (Basel) 12, 294 (1956)
- Lüscher, E.F. Ein Fibrinstabilisierender Faktor aus Thrombocyten. *Schweiz.Med.Wschr.* 39/40 (1957)
- Lüscher, E.F. Thrombocytenfaktoren. *Erg. Phys.* 50 1 (1959)
- Lüscher, E.F. and Bettex-Galland, M. Extraction of an actomyosin-like Protein from Human Throbocytes. *Nature* (London) 184, 276 (1959)
- Magalini, S.L. and Stefanini, M. Clot retraction promoting factor (retractin) in platelets and tissues. *Science* 123, 796 (1959)
- Marshall, G. et Lerueux, M. Aspecte thrombo-dynamographiques de la synérse et de la rétraction du caillet ou de sa lyse pathologique. *Proc.of the 6th Congr.Europ.Sec. Haem.* 478 (1957)
- Marx, R. Zur Kenntniss der für die Thrombusfestigkeit bedeutsamen Blutfaktoren. Zugleich ein Beitrag zum Problem einer unspezifischen Blutstillungsförderung durch Transfusionen. *Ergebnisse der Bluttransfusionsforschung Bd. III*, 147 (1957)
- Quick, A.J. The physiology and pathology of haemostasis. London and Philadelphia 1951

Schulz, H. und
Hiepler, E.

Über die Lokalisierung von gerinnungsphysiologischen Aktivitäten in submikroskopischen Strukturen der Thrombocyten.
Klin.Wschr. 6, 273 (1959)

Ware, A.G., Fahey, J.L.,
Seegers, W.H.

Platelet extracts, fibrin formation and interaction of purified prothrombin and thromboplastin.
Amer.J.physiol. 154, 140 (1948)

Werner, K.

Die spontane Retraktion des Blutkuchens.
Kli. Wo. 24-25, 414 (1943)

Lebenslauf

Am 5. Oktober 1936 wurde ich, Waltraut Donalies, als zweites Kind des Diplomvolkswirts Hans Donalies und seiner Ehefrau Annerose, geborene Berneburg, in Weimar geboren und evangelisch getauft. 1942 wurde ich eingeschult und besuchte zwei Jahre lang die Volksschule in Weimar.

Im August 1944 übersiedelten wir nach Nikolai bei Kattowitz, Oberschlesien.

Im Juli 1945 flüchteten wir nach Schlüchtern, Hessen. Ab Frühjahr 1946 besuchte ich die dortige Volksschule. Ostern 1946 wurde ich in die Sexta der Ullrich-von-Hutten-Schule aufgenommen.

Im August 1953 übersiedelten wir nach Frankfurt/M. Dort bestand ich 1956 das Abitur der Schillerschule.

Den Sommer 1956 verbrachte ich in England und begann im Herbst des gleichen Jahres mein Studium der Medizin an der Johann-Wolfgang-von-Goethe-Universität, Frankfurt/Main.

Am 30. April 1959 bestand ich hier das Physikum und nach weiteren 6 Semestern klinischen Studiums im Sommersemester 1962 das Staatsexamen.

